

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS EDUARDO KREZANOSKI

NEMATOIDES ASSOCIADOS À CULTURA DO MORANGUEIRO NO ESTADO DO
PARANÁ

CURITIBA

2018

CARLOS EDUARDO KREZANOSKI

NEMATOIDES ASSOCIADOS À CULTURA DO MORANGUEIRO NO ESTADO DO
PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte

Coorientador: Arlei Maceda

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak

Orientadora: Prof^a. Dra. Renata Faier Calegario

CURITIBA

2018

Krezanoski, Carlos Eduardo
Nematoides associados à cultura do morangueiro no estado do Paraná
/ Carlos Eduardo Krezanoski. - Curitiba, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia -
(Produção Vegetal).

Orientador: Henrique Da Silva Silveira Duarte

Coorientador: Arlei Maceda

Coorientadora: Maria Aparecida Cassilha Zawadneak

Coorientadora: Renata Faier Calegario

1. Fitonematoides. 2. Morango – Doenças e pragas. 3. Morango –
Paraná. 4. Fitopatologia. I. Duarte, Henrique Da Silva Silveira. II.
Maceda, Arlei. III. Zawadneak, Maria Aparecida Cassilha. IV. Calegario,
Renata Faier. V. Título. VI. Universidade Federal do Paraná.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CARLOS EDUARDO KREZANOSKI** intitulada: **NEMATÓIDES ASSOCIADOS À CULTURA DO MORANGUEIRO NO ESTADO DO PARANÁ**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Julho de 2018.



HENRIQUE DA SILVA SILVEIRA DUARTE
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



WAGNER VICENTE PEREIRA
Avaliador Externo (UFPR)



MARIA APARECIDA CASSILHA ZAWADNEAK
Coorientador - Avaliador Interno (UFPR)



RENATA FAIER CALEGARIO
Avaliador Externo (UFPR)

Sou parte das suas vidas e vocês são toda a Minha história

Luiz Carlos Krezanoski

Ana Rita Krezanoski

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e o presente momento.

Aos meus pais, Luiz Carlos Krezanoski e Ana Rita Krezanoski, por todo apoio ao longo da minha vida, sendo minhas maiores referências de seres humanos.

Aos meus irmãos, Luiz Gustavo Krezanoski e Otavio José Krezanoski. A toda minha família pelo incentivo.

A todos os professores, pelo conhecimento agregado em minha formação. Ao professor Henrique da Silva Silveira Duarte pela orientação, a Prof^a. Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak e a Prof^a. Dra. Renata Faier Calegario pela coorientação.

Aos técnicos e colegas do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti em especial ao mestre Arlei Maceda pelo suporte na identificação dos nematoides e coorientação.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram ao longo desse caminho. Aos amigos que ganhei na universidade Camila, Daniele, Eliane, Evandro, Flávia, Gabriel, Glória, Guilherme, Heloisa, Juliana, Jhulia, Lívia, Marlon, Mônica, Mireli, Micheli Pamela, Renan, Rafaele, Thiago, Wagner e a todos que passaram pelo laboratório de epidemiologia para manejo integrado de doenças de plantas (LEMID) pelo apoio e amizade ao longo dessa caminhada.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) pelos recursos oferecidos para a realização deste trabalho. A Capes pela concessão da bolsa.

Aos produtores de morango por abrirem as porteiças de suas propriedades e aos funcionários da Empresa de assistência técnica do Paraná (EMATER). E a Bioagro pela doação de mudas de morango.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) está entre as culturas em que os fitonematoides têm causado danos. Entretanto, apesar da importância da cultura para o estado do Paraná, pesquisas a campo sobre fitonematoides são escassas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo coletar e identificar os fitonematoides em morangueiro cultivado nos principais municípios produtores do Estado. Foram coletadas 125 amostras de solo e de raiz entre janeiro e dezembro de 2017, em 14 municípios. As amostras frescas foram processadas para a extração dos nematoides fitoparasitas e estes foram identificados morfológicamente em nível de gênero e contabilizados. Os nematoides *Helicotylenchus dihystra*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* foram identificados em nível de espécie. Os gêneros *Scutellonema*, *Ditylenchus*, *Hemicicliophora*, *Mesocriconema* e *Trichodorus* também estavam presentes nas amostras analisadas, em menor ocorrência. Nossos resultados indicam a presença de nematoides fitoparasitas em todas as áreas produtoras de morango no estado do Paraná. *Helicotylenchus dihystra* é o nematoide de maior frequência no solo e nas raízes. Estes resultados demonstram a necessidade de futuras pesquisas para comprovar seu potencial como praga e sua associação com patógenos de solo.

Palavras-chave: Fitonematoide. Frequência. *Fragaria x ananassa* Duch.

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) is among the crops in which phytonematodes have caused significant damage. However, despite the importance of the crop to the state of Paraná, field researches on phytonematodes are scarce. Thus, the present work aimed to collect and identify the phytonematodes in strawberry cultivated in the main producing municipalities of the State. A total of 125 soil and root samples were collected between January and December 2017 in 14 municipalities. Fresh samples were processed for nematode extraction, which were identified morphologically at the genus level and counted. The nematodes *Helicotylenchus*, *dihystera*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus* were identified at species level. The genera *Scutellonema*, *Ditylenchus*, *Hemicicliophora*, *Mesocriconema* and *Trichodorus* were also present in the analyzed samples, in lesser frequency. Our results indicate the presence of phytoparasite nematodes in all strawberry producing areas in the state of Paraná. *Helicotylenchus dihystrera* is the most frequent nematode in soil and roots. These results demonstrate the need for future research to prove its potential as a pest and its association with soil pathogens.

Keywords: Phytonematodes, frequency, *Fragaria ananassa* Duch.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 A CULTURA DO MORANGUEIRO	11
2.2 NEMATOIDES.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	155
3.1 LOCAIS AMOSTRADOS.....	155
3.2 COLETA DE AMOSTRAS	155
3.3 EXTRAÇÃO DE NEMATOIDE DO SOLO E RAÍZES	166
3.4 FIXAÇÃO E CONTAGEM DOS NEMATOIDES	177
3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS NEMATOIDES	18
3.5.1 Caracterização morfológica	18
3.5.2 Caracterização por eletroforese de isoenzimas	19
3.5.3 Caracterização molecular.....	200
3.5.3.1 Extração de DNA.....	200
3.5.3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	200
3.5.3.3 Sequenciamento.....	211
4 RESULTADOS.....	222
5 DISCUSSÃO	3232
6 CONCLUSÕES	355
REFERÊNCIAS.....	366

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é cultivado e apreciado nas diversas regiões do mundo. Entre as espécies de pequenas frutas é a de maior área cultivada Brasil (MUSA et al., 2015).

A China, maior produtor mundial de morangos, produziu em 2016 aproximadamente 3,8 milhões de toneladas, sendo seguida pelos Estados Unidos com 1,4 milhões de toneladas e o México com 468 mil toneladas do fruto (Food and Agriculture Organization (FAOSTAT, 2013)). Segundo ultimo Censo agropecuário de 2006 o Brasil produziu aproximadamente 72 toneladas de morango (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009)). Os principais estados produtores são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná (GIMÉNEZ; ANDRIOLO; GODOI, 2008). O Paraná em 2015 produziu aproximadamente 22 mil toneladas em uma área de 723 hectares (Secretaria da Agricultura e do Abastecimento/ Departamento de Economia Rural (SEAB/DERAL, 2017)).

O interesse pela cultura está associado à alta rentabilidade, diversidade na comercialização e boa aceitação pelos consumidores. Além da diversificação das propriedades agrícolas, a cultura se destaca por demandar grande quantidade de mão-de-obra em pequena área, sendo uma opção rentável na agricultura familiar (FACHINELLO et al., 2011; LEMISKA et al., 2014).

O cultivo do morangueiro no solo enfrenta vários problemas fitossanitários, dentre eles, se destacam os artrópodes e moluscos (SOUZA; ZAWADENEAK, 2018) bem como as doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, que danificam os frutos, folhas, caules e raízes em todas as fases de desenvolvimento da cultura (REIS; COSTA, 2011). Dentre os diversos agentes causais os nematoides constituem um fator limitante a produtividade do morangueiro (BRUM et al 2012).

As principais espécies de nematoides relatadas na cultura do morangueiro são: *Meloidogyne hapla* (Kofoid & White) Chitwood, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, *Aphelenchoides besseyi* (Christie), *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos) Christie, *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev, *Xiphinema* spp. Cobb, e *Helicotylenchus*

dihystera Steiner (ARIEIRA et al., 2008). No Brasil, *Meloidogyne hapla*, *Aphelenchoides besseyi*, e *Aphelenchoides fragariae* são consideradas as espécies de maior importância (GOMES; COFCEWICZ, 2003).

Os danos por nematoides geralmente ocorrem nas raízes e são refletidos na parte aérea das plantas com redução de crescimento, amarelecimento, tamanho desigual das plantas e murcha temporária das folhas que resultam em baixa produtividade (ARIEIRA et al., 2008)

Devido à dificuldade de controle, existe grande preocupação quanto à presença de nematoides fitoparasitas associados ao morangueiro. Desta forma identificar os nematoides presentes no campo é o primeiro passo para estabelecer medidas de controle eficientes, entre elas escolha de variedades mais resistentes a serem plantadas.

Considerando a importância da cultura do morangueiro no estado do Paraná, bem como a escassez de trabalhos de levantamento de nematoides na cultura do morangueiro no Brasil, o objetivo do presente trabalho foi identificar e determinar a frequência de fitonematoides presentes em áreas de cultivo do morangueiro nos principais municípios produtores do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MORANGUEIRO

O morango é a fruta mais produzida entre os pequenos frutos, sendo justificada pela alta rentabilidade, opções de comercialização e aceitação pelos consumidores (FACHINELO et al., 2011). A espécie (*Fragaria x ananassa*) cultivada atualmente é um híbrido que resultou do cruzamento de duas espécies *F. virginiana* (de origem Norte Americana) com *F. chiloensis* (de origem Sul Americana) (REIS; COSTA, 2011)

A China e os Estados Unidos são os maiores produtores de morango no mundo, com produção de aproximadamente 3,8 e 1,4 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil, Argentina e Chile são os maiores produtores na América do Sul, sendo responsáveis pela produção de 318 mil toneladas (FAOSTAT, 2013).

O início do cultivo do morangueiro no Brasil é pouco conhecido, passou a ter importância nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul em meados do século 20. Nessa época todas as cultivares eram provenientes dos Estados Unidos e da Europa, apresentando pouca adaptação às condições de clima e solo (OLIVEIRA; BONOW, 2012). Com o surgimento das primeiras cultivares brasileiras em 1960 a produção alavancou e atualmente a produção se destaca na região Sul, Centro-Oeste e Sudeste. Os principais estados produtores são: Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo, Distrito Federal e Santa Catarina (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2014).

Na região metropolitana de Curitiba se concentra o maior polo produtor de morangos do Paraná, esta produção é oriunda do sistema convencional, orgânico e integrado (ZAWADNEAK; SCHUBER; MÓGOR, 2014). A importância desta cultura está relacionada principalmente ao aspecto socioeconômico, pois se trata de uma hortaliça que apresenta alta rentabilidade por área e mobiliza um número significativo de produtores gerando emprego e renda a um expressivo número de trabalhadores familiares rurais durante todo o ciclo de produção (SPECHT; BLUME, 2011).

Um dos grandes problemas enfrentados pelos produtores de morango está relacionado ao manejo. Problemas fitossanitários causados por doenças fúngicas estão entre as mais estudadas no morangueiro, dentre eles se destacam o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), mancha de micosferela (*Mycosphaerella fragariae*), murcha de verticílio (*Verticillium dahliae*) e antracnose (*Colletotrichum* spp.) (REIS; COSTA, 2011). Os nematoides além dos problemas causados pelos danos diretos podem predispor as plantas a infecções secundárias por fungos ou bactérias através da abertura de ferimentos (GOULART, 2008).

2.2 NEMATOIDES

Os nematoides são pequenos vermes encontrados em todas as regiões do mundo habitando preferencialmente a rizosfera (OLIVEIRA et al., 2017). São organismos altamente especializados que possuem diversas estratégias para infectar o sistema radicular e outros órgãos da planta, dificultando a adoção de medidas de controle (HAEGEMAN et al., 2012).

Os sintomas provocados por nematoide são variáveis conforme o hospedeiro e a espécie do nematoide. Os danos geralmente ocorrem nas raízes e são refletidos na parte aérea das plantas com redução de crescimento, amarelecimento, tamanho desigual das plantas e murcha temporária das folhas resultando em baixa produtividade. Plantas recém-transplantadas para o campo podem morrer prematuramente. A falta de raízes sadias prejudica a absorção de nutrientes e translocação dos mesmos gerando alteração na nutrição e na fisiologia das plantas que não irão responder a adubação (ARIEIRA et al., 2008)

No morangueiro as principais espécies de nematoides relatadas são: *Meloidogyne hapla* (Kofoid & White) Chitwood, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, *Aphelenchoides besseyi* (Christie), *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos) Christie, *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev, *Xiphinema* spp. Cobb, e *Helicotylenchus dihystera* Steiner (ARIEIRA et al., 2008)

Dentre as medidas de controle eficientes para o controle destes nematoides, o uso de produtos químicos, rotação e de culturas e uso de cultivares resistente (LEAL-BERTIOLI et al., 2016). No Brasil o uso de cultivares resistente é umas das medidas mais eficientes e de menor custo (BRUM et al., 2012).

Na agricultura mundial os nematoides do gênero *Meloidogyne*, ou nematoide das galhas das raízes podem causar perdas econômicas significativas (LEAL-BERTIOLI et al., 2016), fato este ligado a sua ampla gama de hospedeiros e alta taxa de multiplicação (TRUDGILL et al., 2000; MOENS; PERRY; STARR, 2009). Este gênero conta com 95 espécies já descritas e uma lista de mais de 5.500 espécies de plantas hospedeiras (GHULE; SINGH; KHAN, 2014).

As espécies de nematoides do gênero *Meloidogyne* são endoparasitas sedentários. Neste gênero os juvenis de segundo estágio J2 são formas infectivas. Quando os juvenis encontram uma raiz através dos exsudatos radiculares liberados, os quais penetram e tornam-se sedentários estabelecendo sítios de alimentação. Estes nematoides liberam secreções esofagianas ao perfurarem as raízes das plantas, resultando em hiperplasia e hipertrofia das células ao redor do seu corpo, dando origem as galhas, que são alterações anatômicas das células. Uma fêmea adulta pode depositar uma massa de até 500 ovos que podem ficar no interior ou na superfície da raiz. Após a eclosão os juvenis migram para o solo, penetram em novas raízes e reiniciam assim o ciclo (RITZINGER; FANCELLI; RITZINGER, 2010; GHULE; SINGH; KHAN, 2014).

Os sintomas observados por *Meloidogyne* são nanismo, falta de vigor, e murchando sob estresse de umidade, apresentasm sistema radicular reduzido e engrossamentos nas raízes queu são denominados galhas (BRUM et al.,2012). A infecção por este patógeno afeta a captação de água e nutrientes alem de atuar como porta de entrada para outroa agentes transmissores de doença como fungos e bacterias (CAPRONI et al., 2012).

Os nematoides das lesões radiculares *Pratylenchus* spp. estão entre os principais nematoides que tem causado prejuízos em áreas agrícolas no Brasil. Estes nematoides se caracterizam por serem polípagos, endoparasita migradores que causam severos danos em raízes de uma ampla gama de culturas devido a alimentação, movimentação ativa e liberação de enzimas e toxinas no córtex promovendo a destruição das células do sistema radicular das plantas atacadas. (BRAZ et al., 2016). Atualmente 70 espécies do gênero *Pratylenchus* estão

distribuídas pelo mundo, parasitando dezenas de espécies vegetais (GOULART, 2008). Considerando o impacto econômico para as diferentes culturas o gênero *Pratylenchus* ocupa o segundo lugar entre os nematoides parasitas de plantas, no Brasil as espécies mais importantes são: *P. brachyurus* Filipijev e Schuurmans Stekhoven, *P. zaeae* Graham e *P. coffeae* Filipijev e Schuurmans Stekhoven considerando o número de plantas hospedeiras os danos e as perdas econômicas (GOULART, 2008).

Como endoparasitas migradores este gênero destrói o tecido das raízes e além do rompimento superficial causa destruição interna, predispondo-os a infecções secundárias de fungos e bactérias. Os sintomas por não serem específicos podem ser confundidos com sintomas de outros patógenos, estresse hídrico e deficiência nutricional assim podem passar facilmente despercebidos (GOULART, 2008).

O nematoide espiralado, pertencente ao gênero *Helicotylenchus*, ectoparasita de raízes, apresenta ampla distribuição geográfica, tendo sido assinalado em associações com diversas plantas hospedeiras (SHARMA et al., 1993). Este nematoide depois de morto passa a exibir na sua forma relaxada o corpo enrolado, adotando uma forma espiralada e dando nome comum ao gênero *Helicotylenchus* ou nematoide espiralado.

No Brasil é encontrado frequentemente em amostras de solo em várias regiões e por apresentar ampla distribuição geográfica, são encontrados em diversas culturas e sistemas de cultivo (GARBIN et al., 2015).

A associação das espécies de *Helicotylenchus* a diversas culturas e a elevada perda econômica que causam é preocupante. Já foi identificado *Helicotylenchus* em várias espécies vegetais e em associação a uma infinidade de outros gêneros de nematoides (TOMAZINI; FERRAZ; MONTEIRO, 2008). Na cultura do morango a presença deste fitonematoide já foi assinalada por diversos autores (BÉLAIR; KHANIZADEH, 1994; PARK et al., 2005; SAMALIEV; MOHAMEDOVA, 2011; TSOLOVA; KOLEVA; KALCHEVA, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAIS AMOSTRADOS

A coleta de amostras para identificação de nematoides presentes na cultura do morangueiro ocorreu sob o cultivo convencional em solo no estado do Paraná. Os técnicos do Instituto de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-PR) de cada município forneceram suporte às coletas, selecionando as propriedades de modo que retratasse de forma abrangente o município (TABELA 1).

TABELA 1- REGIÕES DE COLATA NO ESTADO DO PARANÁ

Município	n° de propriedades amostradas	Cultivar
São José Pinhais	49	San Andreas, Albion, Portola
Araucária	15	San Andreas, Albion, Portola
Lapa	6	Albion, Monte Rei
Campo Largo	2	Albion
Colombo	2	Albion
Jaboti	10	Persink, Camino Real, Camarosa, Tudla, Sabrina
Japira	9	Flórida, Osso Grande, Camino Real, Camarosa, Tudla,
Pinhalão	8	Camino Real, Camarosa, Persink, San Andreas
Conselheiro Marink	6	Camarosa, Persink, San Andreas
Prudentópolis	8	Camino Real, San Andreas
Rio Azul	2	Albion
Malett	2	San Andreas, Albion
Irati	1	Albion
Pato Branco	5	Camarosa, Albion
Total	125	

3.2 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de solo e raízes de morangueiro foram coletadas no período de janeiro a dezembro do ano de 2017 em 125 propriedades. A coleta foi realizada preferencialmente em plantas com redução no crescimento e/ou com sintomas em reboleiras. Nas propriedades onde não foram observadas essas características foram coletadas plantas de forma aleatória.

As amostras foram coletadas com auxílio de uma pá de jardinagem sendo retiradas 10 amostras simples de pontos diferentes em cada propriedade produtora de morango. A profundidade de coleta foi de 0-20 cm. As 10 amostras simples foram depositadas em um recipiente e homogeneizadas resultando em uma amostra composta (1000 g de solo). Também de cada propriedade foi coletado raízes de 10 plantas em diferentes pontos. As amostras de solo e raiz foram acondicionadas separadamente em saco de polietileno com capacidade de 2 litros o que foi vedado e identificado com número da amostra, local e data da coleta. As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor para o transporte até o Laboratório de Nematologia Marcos Enrietti localizado no campus do Setor de Ciências Agrárias UFPR, Curitiba, PR, onde foram realizadas as extrações, quantificações dos nematoides.

3.3 EXTRAÇÃO DE NEMATOIDE DO SOLO E RAÍZES

A extração dos nematoides das amostras compostas de solo foram realizadas pelo método de flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). O solo foi homogeneizado e uma alíquota de 100 cm³ foi colocada em uma cuba com água suficiente para misturar o solo e dissolver os torrões. Foi adicionado cerca de 1 litro de água e permaneceu em repouso por 20 segundos para o material sólido sedimentar. Após esse tempo o sobrenadante foi depositado sobre uma peneira de 20 mesh sobreposta a outra peneira de 400 mesh. O material retido na peneira de 400 mesh foi recolhido e distribuído em tubos de centrifuga (Eppendorf 5810/5810 R), balanceados e posteriormente centrifugados por 4 minutos a 343 g. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em solução de sacarose (454 g de açúcar cristal 1L⁻¹ de água), sendo novamente centrifugado por 1 minuto nas mesmas condições. Em seguida o sobrenadante foi depositado em uma peneira de 500 mesh. O material retido na peneira foi lavado em água corrente e recolhido em um Becker sendo depois transferido para um tubo de ensaio onde permaneceu na geladeira em repouso por uma hora para que os nematoides precipitassem no fundo do tubo e fosse possível reduzir o volume para 4 mL.

A extração dos nematoides das amostras compostas de raízes foi realizada de duas formas. As amostras de raízes com galhas, foram levadas a microscópico estereoscópio para observar a presença de fêmeas de *Meloidogyne* sp. Quando observado as fêmeas as mesmas eram retiradas com auxílio de um estilete e transferidas para uma lâmina escavada com duas gotas de ácido láctico a 45%. As amostras de raízes que não apresentaram galhas foram lavadas em água corrente para retirada do solo presente. A extração foi feita pelo método de flotação com caulim (COOLEN; D'HERDE, 1972). Foram pesadas 10 g de raízes já fragmentadas e colocadas no copo do liquidificador com água até cobrir todo o material e triturada por 20 segundos. A suspensão obtida foi vertida em uma peneira de 100 mesh sobreposta a uma peneira de 500 mesh, e o material restante na peneira foi transferido para um Becker e posteriormente para um tubo de plástico para a centrifugação. Neste tubo foi adicionado caulim, com intuito de separar por densidade os nematoides dos resíduos provenientes da extração, após o caulim ser misturado a amostra o tubo foi calibrado e centrifugado por 4 minutos a 343 g. O sobrenadante desta centrifugação foi descartado e em seguida adicionado solução de sacarose (454 g de açúcar cristal/ 1L⁻¹ de água) e centrifugado novamente por 1 minuto a 343 g. Após a centrifugação o sobrenadante foi vertido em uma peneira de 500 mesh lavado em água corrente para retirar a sacarose, o material retido na peneira foi recolhido em um Becker e transferido para um tubo de ensaio.

3.4 FIXAÇÃO E CONTAGEM DOS NEMATOIDES

Após a extração dos nematoides o sobrenadante foi retirado até obter 4 mL de suspensão contendo os nematoides. Em seguida, os nematoides foram inativados em banho-maria a 54 °C por 1 minuto e, posteriormente, fixados com 4 mL de formol a 5%. Após 1 hora de descanso, o volume foi reduzido novamente a 4 mL. A contagem dos nematoides já fixados foi efetuada em uma lâmina de Peters sob microscópio de luz. Foi contado o número de indivíduos de cada gênero em cada amostra. O número resultante da contagem de cada gênero nos 24 campos na lâmina de Peters foi dividido pelo fator de correção 1,6 e multiplicado por 4, resultando no número total indivíduos de cada gênero do nematoide na amostra.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS NEMATOIDES

3.5.1 Caracterização morfológica

Após a extração dos nematoides de solo e raiz, a identificação dos gêneros foi realizada por meio de características morfológicas seguindo chave de identificação (MAI; MULLIN, 1996). Os dados referentes ao levantamento foram analisados para a caracterização das populações, sendo determinado a frequência e o número médio de nematoides. Os gêneros *Pratylenchus*, *Meloidogyne* e *Helicotylenchus* foram identificados em nível de espécie. Foram então confeccionadas lâminas semipermanentes com *Pratylenchus* e *Helicotylenchus*. Com auxílio de uma agulha, cerca de 10 fêmeas destes gêneros presentes em cada amostra foram transferidas para uma lâmina com formol a 2%, sendo em seguida selada com esmalte incolor. Posteriormente, as lâminas foram observadas ao microscópio de luz, permitindo identificação das espécies utilizando as chaves de identificação (MENDONÇA, 1976; CAFÉ FILHO; HUANG, 1989; CASTILLO; VOVLAS, 2007).

O gênero *Meloidogyne* foi identificado morfológicamente pelo corte da região perineal das fêmeas. As fêmeas previamente depositadas em ácido láctico foram cortadas e o conteúdo interno foi removido através de uma leve pressão. Foram feitos 10 cortes perineais e dispostos em lâmina de microscopia com uma gota de glicerina, os cortes perineais foram levemente pressionados no fundo da gota e enfileirados para facilitar a visualização. A lâmina foi coberta com lamínula, selada com esmalte incolor e identificada. Posteriormente, em microscópio de luz foi observado as linhas laterais e identificado a espécie com auxílio da chave dicotômica (EISENBACH et al., 1981).

As amostras que foram identificadas com fêmeas e/ou juvenil de *Meloidogyne* foram inoculadas em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. 'Santa Clara' para obter fêmeas adultas e ser possível identificar a espécie. Estas amostras foram colocadas em um vaso de 10 litros contendo solo autoclavado e

uma muda de tomateiro. As plantas permaneceram em casa de vegetação (25 ± 5 °C) para multiplicação dos espécimes. Após 90 dias foram coletadas novas amostras dos vasos inoculados com juvenis de *Meloidogyne*. As fêmeas foram identificadas morfológicamente pelo corte da região perineal.

3.5.2 Caracterização por eletroforese de isoenzimas

As espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* foram também caracterizadas por fenótipos isoenzimáticos conforme metodologia descrita por CARNEIRO; ALMEIDA, 2001.

As fêmeas de *Meloidogyne* foram obtidas da raiz de tomateiro, anteriormente infestadas com amostras de *Meloidogyne* identificadas morfológicamente provenientes de áreas produtoras. Em um microscópio estereoscópico, com auxílio de uma agulha foram retiradas cerca de 30 fêmeas das raízes e colocadas em um tubo de polipropileno com 20 µL da solução tampão constituída de 2 gramas de glicerol, 0,2 gramas de Triton X-100, e 7,8 mL de água destilada que foi mantida em ambiente refrigerado.

Após a obtenção das fêmeas, foi preparado um gel de poliacrilamida a 6%. As fêmeas foram então maceradas dentro de um tubo de polipropileno com um bastão de vidro com extremidade arredondada. A suspensão resultante da maceração foi aplicada nas cavidades do gel com uma seringa Hamilton de 10 µL.

Foram utilizadas para corrida eletroforética um macerado com cerca de 15 fêmeas em cada cavidade do gel. Para comparação do extrato proteico foi utilizado fêmeas de *Meloidogyne javanica* oriundas de uma população pura, as quais foram depositadas em 2 cavidades do gel para comparação dos fenótipos encontrados. Depois de aplicadas as amostras, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese e ligada a uma fonte constante de 80 V esta cuba foi levada a um refrigerador e mantida a temperatura de 14 a 17 °C. Para que fosse possível acompanhar a migração, duas cavidades receberam azul de bromofenol a 0,1% e após percorrer 6 cm do gel a fonte foi desligada.

Após o término da eletroforese o gel foi retirado da cuba com uma espátula e mergulhado em um gerbox contendo solução de tampão fosfato (50 mg de Fast Blue

RR Salt e 1,5 mL de α -naftilacetato 1%) para visualização da enzima esterase. O gel em seguida foi levado para incubação em estufa onde permaneceu em uma temperatura de 37 °C por 15 a 20 minutos e então fixado por 30 minutos em uma solução contendo 10% de ácido acético e 40% de solução de álcool metílico. O gel após a revelação e fixação foi disposto entre duas folhas de papel celofane que foi seco a temperatura ambiente por 24 horas.

3.5.3 Caracterização molecular de *Helicotylenchus*

3.5.3.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de um único indivíduo de uma população de *Helicotylenchus*. Inicialmente, em um tubo de polipropileno, foi diluído 25 μ L de tampão de lise Holterman (Lysis Buffer HLB) (proteinase K 800 μ L/mL, β -mercaptoetanol 1% (v/v), NaCl 0,2 M e Tris HCl 0,2 M pH 8) em 25 μ L de água ultrapura totalizando 50 μ L. Em uma lâmina de vidro foram adicionados 5 μ L do tampão de lise na qual o nematoide foi seccionado com o auxílio de um estilete. O nematoide cortado transversalmente e a solução presente na lâmina foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 0,2 mL. O restante da solução (45 μ L) foi utilizado para lavar a lâmina onde o nematoide foi cortado e transferido para o tubo contendo o nematoide seccionado. Posteriormente, as amostras foram incubadas em um termociclador a 65 °C por 2 horas e a 99 °C por 5 minutos, sendo posteriormente armazenadas a -20 °C (CONSOLI et al., 2012).

3.5.3.2 Polimerization Chain Reaction (PCR)

Para a identificação da espécie do nematoide, foi amplificado um fragmento de DNA referente ao fragmento da região interagência D2-D3 do gene 28S rRNA, seguido de sequenciamento do DNA. Para amplificação da região 28S rRNA foram

utilizados os primers universais D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') e D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'). A reação foi constituída de 12,5 µL de Go Taq® Master Mix (Promega), 10 Mm de cada iniciador, 2 µL de DNA genômico (553,7 ng/µL) e 8,5 µL de água ultrapura, totalizando volume final de 25 µL. As condições de amplificação da PCR foram 95 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 68 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 7 minutos. O produto da PCR foi corado com gelRed (Biotium) foi adicionado em gel de agarose 1% e submetido a eletroforese durante 45 min. O gel foi depositado em transluminador UV para visualização das amplificações do DNA.

3.5.3.3 Sequenciamento

O sequenciamento do fragmento da região 28S rRNA amplificado foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, via método Sanger utilizando um sequenciador 3500xL Genetic Analyzer. A qualidade e alinhamento das sequências foram realizadas pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Versão 7.0.4.1; Hall, 1999), gerando-se a sequência consenso, que foi alinhada com outras sequencias pelo programa Mega. A sequência foi comparada com outras depositadas no GenBank pelo site do National Center For Biotechnology Information (NCBI) utilizando o programa BLASTN 2.2.19.

4 RESULTADOS

As avaliações de nematoides em morangueiro nas 14 regiões produtoras indicaram que 99,2% das amostras apresentaram pelo menos um gênero de nematoide fitopatogênico.

Das amostras de raiz analisadas foram identificados oito gêneros de fitonematoides parasitas em associação com o morangueiro. Entretanto a frequência foi variável. Os gêneros *Helicotylenchus* e *Pratylenchus* apresentaram uma maior frequência nas raízes com 87,2% e 20,8%, respectivamente (TABELA 2). Também *Scutellonema* 6,4%, *Ditylenchus* 5,6% *Meloidogyne* 3,2%, *Hemicycliophora* 3,2%, *Mesocriconema* 2,4% e *Trichodorus* 2,4% foram identificados com menor frequências nas raízes (TABELA 2).

O número médio de nematoides encontrado nas raízes das 125 amostras de morangueiro foram *Meloidogyne* 77,9, *Helicotylenchus* 73,8, *Pratylenchus* 6,6, *Scutellonema* 0,7, *Ditylenchus* 0,1, *Mesocriconema* 0,3, *Hemicycliophora* 0,4 e *Trichodorus* 0,04 respectivamente (TABELA 3).

Nas amostras de solo *Helicotylenchus* e *Scutellonema* foram os mais frequentes com 96 e 19,2% das amostras analisadas (TABELA 4). Também *Pratylenchus* 11,2%, *Hemicycliophora* 8%, *Xiphinema* 8%, *Ditylenchus* 8%, *Mesocriconema* 4,8%, *Trichodorus* 4% e *Meloidogyne* 3,2% foram identificados com menor frequência nas amostras de solo (TABELA 4). O número médio de nematoides encontrados nas 125 amostras de solo foi de: *Helicotylenchus* 408,3, *Meloidogyne* 3,8, *Hemicycliophora* 6,6, *Scutellonema* 1,0, *Ditylenchus* 0,4, *Pratylenchus* 1,4, *Xiphinema* 0,5, *Trichodorus* 0,3, e *Mesocriconema* 0,1 (TABELA 5).

TABELA 2 - FREQUÊNCIA (%) DE NEMATOIDES EM RAÍZES DE MORANGUEIRO NOS PRINCIPAIS MUNICÍPIOS PRODUTORES DO PARANÁ.

Região/Município (N) n° de amostras	Frequência (%) raiz								
	<i>Helico</i> ¹ .	<i>Praty</i> ² .	<i>Scutel</i> ³ .	<i>Dity</i> ⁴ .	<i>Mel</i> ⁵ .	<i>Hemicy</i> ⁶ .	<i>Mesoc</i> ⁷ .	<i>Tricho</i> ⁸ .	<i>Xiph</i> ⁹ .
Metropolitana									
S.J.dos Pinhais (49)	93,8	0	4	4	0	8,1	2	2	0
Araucária (15)	86,6	0	0	0	13,4	0	0	6,6	0
Lapa (06)	100	16,6	0	0	0	0	0	0	0
Campo Largo (02)	100	0	50	50	0	0	0	0	0
Colombo (02)	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Total (74)	93,2	1,3	4	4	2,7	5,4	1,3	4	0
Norte pioneiro									
Jaboti (10)	80	40	10	20	10	0	0	0	0
Japira (09)	77,7	77,7	0	0	11,1	0	0	0	0
Pinhalão (08)	87,5	62,5	12,5	0	0	0	0	12	0
C. Marink (06)	66,6	83,3	33,3	33,3	0	0	0	0	0
Total (33)	78,7	63,6	12,1	12,1	6	0	0	3	0
Sudeste									
Prudentópolis (08)	62,5	25	0	0	0	0	0	0	0
Rio Azul (02)	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Malett (02)	100	0	0	0	0	0	50	0	0
Irati (01)	0	0	0	0	0	0	100	0	0
Total (13)	69,2	13,3	0	0	0	0	15,3	0	0
Sudoeste									
Pato Branco (05)	100	40	0	0	0	0	0	0	0
Total (5)	100	44,4	0	0	0	0	0	0	0
Total geral (125)	87,2	20,8	6,4	5,6	3,2	3,2	2,4	2,4	0

1-*Helicotylenchus*, 2- *Pratylenchus*, 3- *Scutellonema*, 4- *Ditylenchus*, 5- *Meloidogyne*, 6- *Hemicycliophora*, 7- *Mesocriconema*, 8- *Trichodorus*, 9- *Xiphinema*.

TABELA 3 - MÉDIA DE NEMATOIDES (NÚMERO MÍNIMO E MÁXIMO POR AMOSTRA) DE MORANGUEIRO OBTIDAS A PARTIR DE COLETA NOS PRINCIPAIS MUNICÍPIOS PRODUTORES DO PARANÁ.

Região/Município (N) n° de amostras	Número médio de nematoides na raiz								
	<i>Mel</i> ¹ .	<i>Helico</i> ² .	<i>Praty</i> ³ .	<i>Scutel</i> ⁴ .	<i>Dity</i> ⁵ .	<i>Mesoc</i> ⁶ .	<i>Hemiciy</i> ⁷ .	<i>Tricho</i> ⁸ .	<i>Xiph</i> ⁹ .
Metropolitana									
S.J. dos Pinhais (49)	0	87,9 (0-567)	0	0,3(0-12)	0	0,6 (0-10)	1 (0-10)	1(0-2)	0
Araucária (15)	95,3 (0-1400)	126,8 (0-815)	0	0	0	0	0	0,1(0-2)	0
Lapa (06)	0	80,1 (25-180)	2 (0-12,5)	0	0	0	0	0	0
Campo Largo (02)	0	17,5 (15-20)	0	2	0	0	0	0	0
Colombo (02)	0	70 (20-120)	0	0	0	0	0	0	0
Média (74)	19,3	92,80	0,1	0,2	0	0,4	0,6	0,06	0
Norte pioneiro									
Jaboti (10)	607,5 (0-6075)	10,7 (0-30)	6 (0-17)	0,7 (0-2)	0,2 (0-2)	0	0	0	0
Japira (09)	248,3 (0-2235)	38,6 (0-165)	45,2 (0-225)	0	0	0	0	0	0
Pinhalão (08)	0	95,9 (0-122)	5,9 (0-12)	0,3 (0-2)	0	0	0	1,2 (0-10)	0
C. Marink (06)	0	33,3 (0-90)	47 (0-180)	10 (0-62)	1,6 (0-5)	0	0	0	0
Média (33)	251,8	43,1	24,1	2,2	0,3	0	0	0,3	0
Sudeste									
Prudentópolis (08)	0	25,3 (0-55)	1,8 (0-12)	0	0	0	0	0	0
Rio Azul (02)	0	62 (10-112)	0	0	0	0	0	0	0
Malett (02)	0	120 (30-210)	0	0	0	2,5 (0-5)	0	0	0
Irati (01)	0	0	0	0	0	6 (6)	0	0	0
Média (13)	0	43,6	1,1	0	0	0,57	0	0	0
Sudoeste									
Pato Branco (05)	0	74,5 (40-110)	1,5 (0-5)	0	0	0	0	0	0
Média (5)	0	74,5	1,5	0	0	0	0	0	0
Média total (125)	77,9	73,8	6,6	0,7	0,1	0,3	0,4	0,04	0

1- *Helicotylenchus*, 2- *Pratylenchus*, 3- *Scutellonema*, 4- *Ditylenchus*, 5- *Meloidogyne*, 6- *Hemicycliophora*, 7- *Mesocriconema*, 8- *Trichodorus*, 9- *Xiphinema*.

TABELA 4 - FREQUÊNCIA (%) DE NEMATÓIDES EM SOLO DE MORANGUEIRO NOS PRINCIPAIS MUNICÍPIOS PRODUTORES DO PARANÁ.

Região/Município (N) n° de amostras	Frequência (%) solo								
	<i>Helico</i> ¹ .	<i>Scutel</i> ² .	<i>Praty</i> ³ .	<i>Hemicy</i> ⁴ .	<i>Xiph</i> ⁵ .	<i>Dity</i> ⁶ .	<i>Mesoc</i> ⁷ .	<i>Tricho</i> ⁸ .	<i>Mel</i> ⁹ .
Metropolitana									
S.J. dos Pinhais (49)	100	10,2	0	28,5	2	10,2	4,1	2	0
Araucária (15)	86,6	6,66	0	46,6	6,6	6,6	6,8	0	13,4
Lapa (06)	100	0	0	16,6	16,6	0	0	16,6	0
Campo Largo (02)	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Colombo (02)	100	0	0	50	0	0	0	0	0
Total (74)	97,2	8,1	0	31,1	4	8,1	4	2,7	2,7
Norte pioneiro									
Jaboti (10)	90	10	40	0	0	10	0	0	10
Japira (09)	88,8	0	33,3	0	0	0	11,1	11,1	11,1
Pinhalão (08)	100	0	0	0	0	12,5	12,5	0	0
C. Marink (06)	83,3	0	100	0	33,6	0	16,6	0	0
Total (33)	90,9	3	36,3	0	6,1	6,1	9,1	3,1	6,1
Sudeste									
Prudentópolis (08)	100	12	12	12	12	0	0	12	0
Rio Azul (02)	100	0	0	0	50	0	0	0	0
Malett (02)	100	0	0	0	50	0	0	0	0
Irati (01)	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Total (13)	100	7,6	7,6	7,6	23	0	0	7,6	0
Sudoeste									
Pato Branco (05)	100	40	0	0	40	40	0	20	0
Total (5)	100	40	0	0	40	40	0	20	0
Total geral (125)	96	19,2	11,2	8	8	8	4,8	4	3,2

1- *Helicotylenchus*, 2- *Scutellonema*, 3- *Pratylenchus*, 4- *Hemicycliophora*, 5- *Xiphinema*, 6- *Ditylenchus*, 7- *Mesocriconema*, 8- *Trichodorus*, 9- *Meloidogyne*.

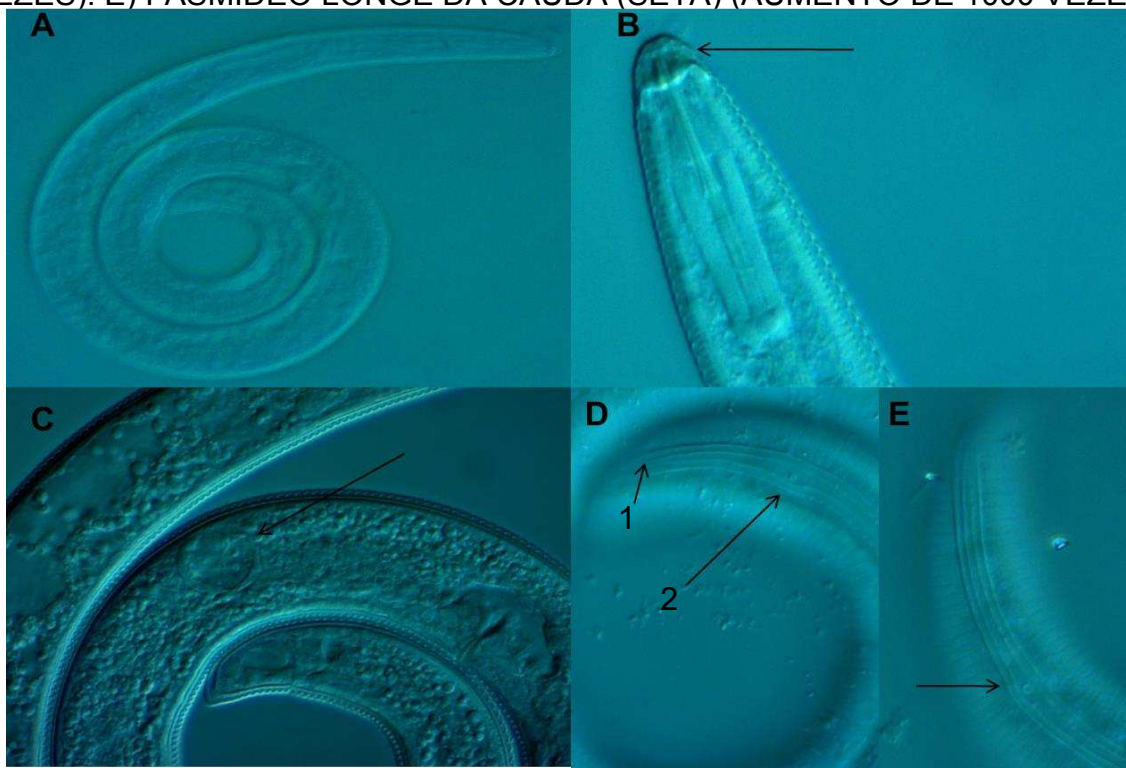
TABELA 5 - MÉDIA DE NEMATOIDES (NÚMERO MÍNIMO E MÁXIMO POR AMOSTRA) DE MORANGUEIRO NOS PRINCIPAIS MUNICÍPIOS PRODUTORES DO PARANÁ.

Região/Município (N) n° de amostras	Número médio de nematoides no solo (%)								
	<i>Helico</i> ¹ .	<i>Mei</i> ² .	<i>Hemiciy</i> ³ .	<i>Scutel</i> ⁴ .	<i>Dity</i> ⁵ .	<i>Praty</i> ⁶ .	<i>Xiph</i> ⁷ .	<i>Tricho</i> ⁸ .	<i>Mesoc</i> ⁹ .
Metropolitana									
S.J. dos Pinhais (49)	463,8 (70-1620)	0	6,4 (0-192)	1,4 (0-90)	0,2 (0-12)	0	0,1 (0-7)	0,1 (0-10)	0,1(0-10)
Araucária (15)	762 (0-1560)	7,9 (0-112)	12,8 (0-50)	0,3 (0-5)	0,7 (0-12)	0	0,3 (0-5)	0	0,3 (0-5)
Lapa (06)	253,3 (57-1950)	0	2,5 (0-15)	0	0	0	1,6 (0-10)	1,6 (0-10)	0
Campo Largo (02)	186,2 (142-230)	0	0	0	0	0	0	0	0
Colombo (02)	518,7 (65-972)	0	66,2 (0-132)	0	0	0	0	0	0
Média (74)	479,1	1,61	11,1	1,5	0,4		0,3	0,2	0,2
Norte pioneiro									
Jaboti (10)	67,2 (0-280)	18,7 (0-187)	0	0,7 (0-7)	0,2 (0-12)	2 (0-7)	0	0	0
Japira (09)	290,2 (0-600)	20 (0-180)	0	0	0	5,5 (0-32)	0	0,2 (0-2)	0,2 (0-2,5)
Pinhalão (08)	399,6 (35-1200)	0	0	0	0,3 (0-2)	0	0	0	0,6 (0-5)
C. Marink (06)	264,2 (0-600)	0	0	0	0	16,6 (5-40)	1,25 (0-5)	0	2 (0-12)
Média (33)	244,4	11,1	0	0,2	0,4	5,1	0,2	0,07	0,1
Sudeste									
Prudentópolis (08)	147,1 (7-1920)	0	0,6 (0-5)	0,3 (0-2)	0	0,9 (0-2)	1,8 (0-2)	1,5 (0-12,5)	0
Rio Azul (02)	168,7 (97-240)	0	0	0	0	0	1,2 (0-2)	0	0
Malett (02)	46,2 (30-62)	0	0	0	0	0	2,5 (0-5)	0	0
Irati (01)	155 (155)	0	0	0	0	0	0	0	0
Média (13)	443,2	0	0,3	0,1	0	0,5	1,7	0,9	0
Sudoeste									
Pato Branco (05)	350 (117-825)	0	0	1 (0-2,5)	2 (0-5)	0	1,5 (0-6)	0,5 (0-2)	0
Média (5)	350	0	0	1	2	0	1,5	0,5	0
Média total (125)	408,3	3,8	6,6	1,0	0,4	1,4	0,5	0,3	0,1

1-*Helicotylenchus*, 2- *Meloidogyne*, 3- *Hemicycliophora*, 4- *Scutellonema*, 5- *Ditylenchus* 6- *Pratylenchus* 7- *Xiphinema*, 8- *Trichodorus*, 9- *Mesocriconema*.

A identificação morfológica de espécie ocorreu para os gêneros *Helicotylenchus*, *Pratylenchus* e *Meloidogyne*. O resultado da identificação morfológica de *Helicotylenchus* de acordo com a chave (MENDONÇA, 1976) apontou para a possibilidade *Helicotylenchus dihyстера*. As características observadas na espécie foram espermateca vazia, quatro ânulos labiais bem definidos, linhas laterais com junção no final da cauda e fasmídeo localizado entre as linhas. O fasmídeo em alguns exemplares se localiza próximo à cauda e em outros exemplares acima da cauda isto deixou dúvidas sobre a ocorrência desta variação dentro da espécie *Helicotylenchus dihyстера* ou outra espécie de *Helicotylenchus* (FIGURA 1).

FIGURA 1 - PRINCIPAIS CARACTERES MORFOLÓGICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Helicotylenchus dihyстера*. A) FÊMEA, EXIBINDO CORPO ESPIRALADO (AUMENTO DE 400 VEZES). B) REGIÃO ANTERIOR, EXIBINDO QUATRO ÂNULOS LABIAIS (SETA) (AUMENTO DE 1000 VEZES). C) ESPERMATECA GRANDE E VAZIA (SETA) (AUMENTO DE 1000 VEZES). D) JUNÇÃO DE LINHAS LATERAIS PRÓXIMO AO FINAL DA CAUDA (SETA 01) POSIÇÃO DO FASMÍDEO PRÓXIMO A CAUDA (SETA 02) (AUMENTO DE 1000 VEZES). E) FASMÍDEO LONGE DA CAUDA (SETA) (AUMENTO DE 1000 VEZES).

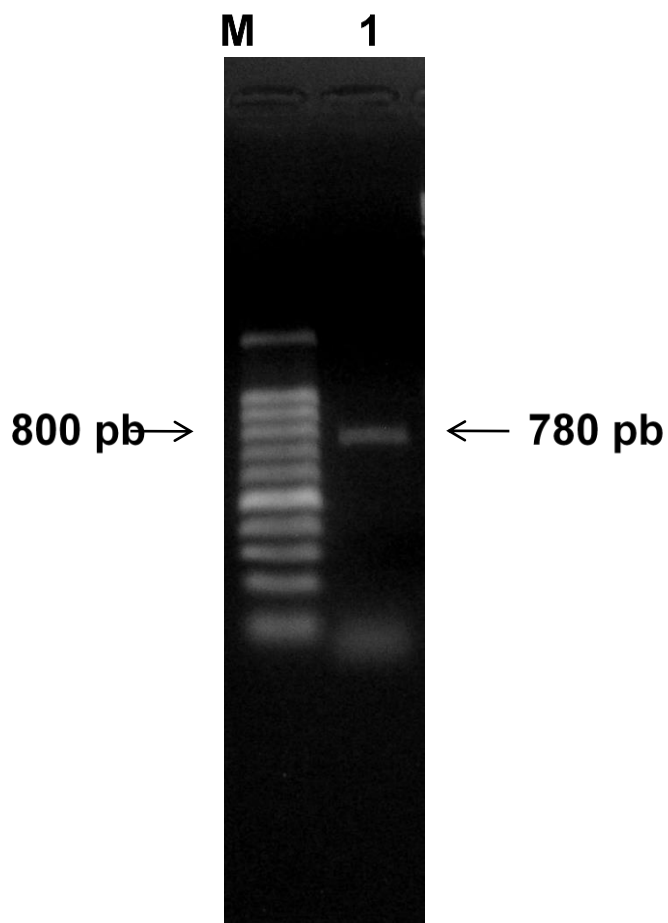


FONTE: O AUTOR 2018

Esta hipótese foi comprovada por método molecular seguido de sequenciamento, onde houve a amplificação do fragmento de 780 pares de base

(pb) referente a região 28S do rRNA, da espécie *Helicotylenchus* (FIGURA 2). O sequenciamento do fragmento gerado obteve 100% de identidade com as sequências de *Helicotylenchus dihystra* depositadas no (NCBI).

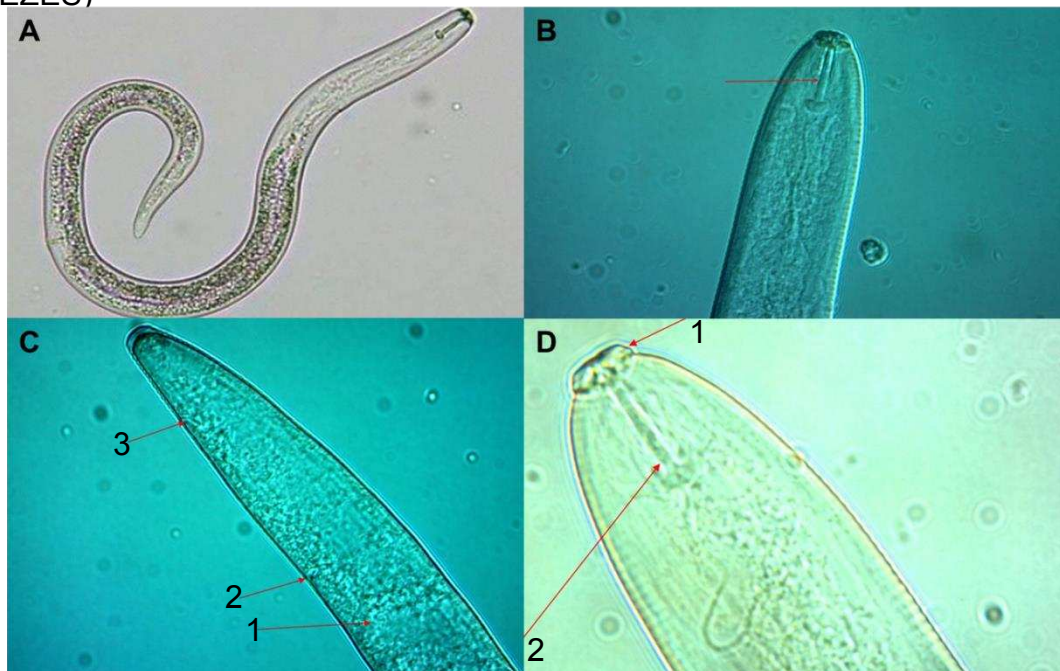
FIGURA 2 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DOS FRAGMENTO AMPLIFICADO CORRESPONDENTE À REGIÃO 28S DO rRNA de *Helicotylenchus dihystra*. M= MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100PB LADDER (PROLAB).



FONTE: O AUTOR 2018

A espécie de *Pratylenchus brachyurus* foi identificada através das características morfológicas sendo possível observar nódulos basais esféricos, estilete robusto, espermateca pequena próxima à vulva, distância entre a vulva e o ânus e a região labial angulosa exibindo dois anéis de acordo com a chave proposta por (CAFÉ FILHO; HUANG, 1989; CASTILLO; VOVLAS, 2007) (FIGURA 3).

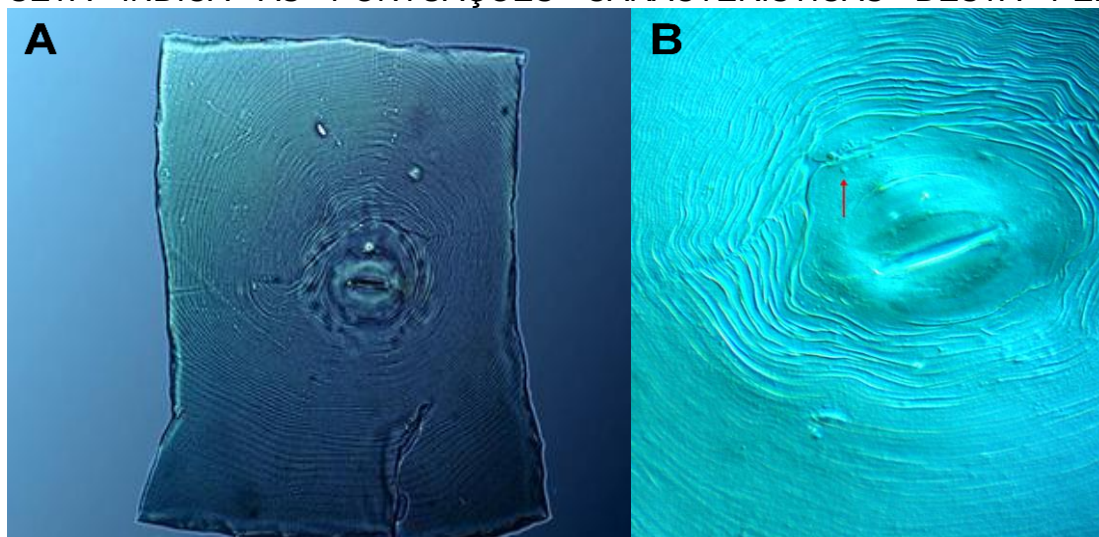
FIGURA 3 - PRINCIPAIS CARACTERES MORFOLÓGICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus*. A) FÊMEA, EXIBINDO CORPO ROBUSTO (AUMENTO DE 400 VEZES). B) REGIÃO ANTERIOR, EXIBINDO O ESTILETE COM NÓDULOS BASAIS ESFÉRICOS (AUMENTO DE 1000 VEZES). C) ESPERMATECA PEQUENA PRÓXIMA A VULVA (1) DISTÂNCIA ENTRE VULVA E ÂNUS (02 E 03) (AUMENTO DE 1000 VEZES). D) REGIÃO LABIAL ANGULOSA, EXIBINDO DOIS ANÉIS (01), ESTILETE ROBUSTO (02) (AUMENTO DE 1600 VEZES)



FONTE: O OUTOR 2018

Para o gênero *Meloidogyne* foi utilizada a morfologia do corte da região perineal das fêmeas na qual o padrão de estrias ao redor da perineal e as pequenas pontuações localizadas acima da perineal identificaram a espécie *Meloidogyne hapla* (FIGURA 4).

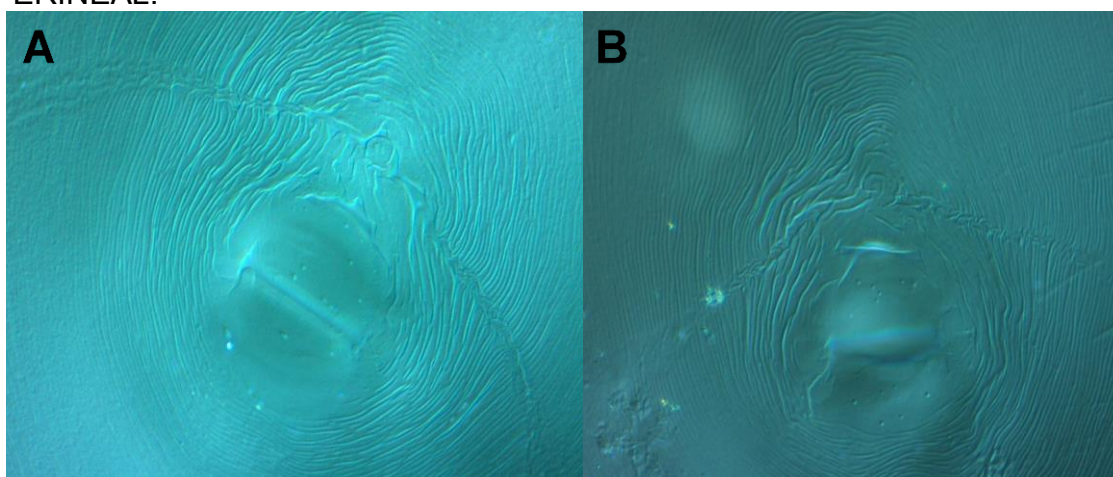
FIGURA 4 - PADRÃO PERINEAL DE *Meloidogyne hapla*. A) CORTE PERINEAL VISÃO GERAL. B) CONFIGURAÇÃO PERINEAL TÍPICA DE *Meloidogyne hapla*, A SETA INDICA AS PONTUAÇÕES CARACTERÍSTICAS DESTA PERINEAL.



FONTE: O AUTOR 2018

Em amostra oriunda de Araucária foi observado no corte perineal da fêmea uma linha marcante dividindo a perineal e configuração das estrias diferenciando esta espécie, sendo possível identificar *Meloidogyne javanica* (FIGURA 5).

FIGURA 5 - PADRÃO PERINEAL DE *Meloidogyne javanica*. A-B) CONFIGURAÇÃO PERINEAL TÍPICA DE *Meloidogyne javanica*, COM LINHA MARCANTE DIVIDINDO A PERINEAL.



FONTE: O AUTOR 2018

As espécies de *Meloidogyne hapla* e *Meloidogyne javanica* também foram identificadas por meio de padrão isoenzimático. As amostras com *Meloidogyne hapla* foram provenientes de coletas nos municípios de Araucária Jaboti e Japira.

Também foi identificado *Meloidogyne javanica* em duas amostras oriundas de Araucária, nas quais uma delas apresentava mistura com *Meloidogyne hapla*.

5 DISCUSSÃO

Os Nematoides considerados mais importantes a cultura do morangueiro *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Aphelenchoides* não foram encontrados em grande frequência no estado do Paraná, sendo observado 3,2% de *Meloidogyne* e 20,8% de *Pratylenchus*. Apesar de *Helicotylenchus* não ser considerado um gênero importante na cultura do morangueiro foi o que obteve maior frequência.

Trabalhos de levantamento e identificação de nematoides no Brasil são comuns em diversas culturas como algodão (*Gossypium hirsutum*), soja (*Glycine max*) (PEREIRA et al., 2015) cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (BELLÉ et al., 2014) e olerícolas (SILVA; SANTOS; SILVA, 2016). Entretanto, para a cultura do morangueiro há um único levantamento no estado de São Paulo para o *Meloidogyne hapla* (SILVEIRA et al., 1989). Com o presente trabalho no Paraná foi possível ter um panorama da população de nematoide presente no campo na cultura do morangueiro. Estes levantamentos populacionais são importantes para identificar a comunidade nematológica e determinar a distribuição desses nematoides em uma dada localidade. Esse conhecimento irá possibilitar o início de pesquisas sobre a ecologia e os métodos de controle de nematoides, e tais estudos são importantes para a adoção de medidas de controle antes que os patógenos atinjam o nível de dano econômico.

Os fitonematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* e *Pratylenchus* são relatados como parasitas de maior importância para a cultura do morango (GOMES; COFCEWICZ, 2003). Estão entre os principais identificados em Quebec no Canadá (BÉLAIR; KHANIZADEH, 1994). Em São Paulo o *M. hapla* é a espécie de nematoide das galhas com maior ocorrência nos cultivos de morangueiro (SILVEIRA et al., 1989). No entanto, no presente estudo além do *Meloidogyne hapla* foi identificado na região Metropolitana de Curitiba e no Norte Pioneiro *Meloidogyne javanica*. Ainda outras espécies de *Meloidogyne* são relatadas no morangueiro pelo mundo entre elas *Meloidogyne incognita* (PARK et al., 2005; CHEN; TSAY, 2006), *Meloidogyne javanica* (LIMA et al., 2013), *Meloidogyne ethiopica* (SOMAVILLA et al., 2006) e *Meloidogyne arenaria* (PARK et al., 2005; CHEN; TSAY, 2006).

A baixa frequência da ocorrência do gênero *Meloidogyne* em morangueiro no Paraná pode estar relacionada à resistência das cultivares. Já foi observado no

Rio Grande do Sul resistência das cultivares San Andreas, Albion, Camino Real e Camarosa ao *Meloidogyne javanica* (LIMA et al., 2013). Estas variedades resistentes são as predominantes no estado do Paraná. Em outros trabalhos foram observados a resistência de cultivares de morango a *M. ethiopica* (SOMAVILLA et al., 2006), *M. arenaria* (BRUM et al., 2012).

Outro gênero importante identificado na cultura do morangueiro foi o *Pratylenchus*, sendo a espécie *Pratylenchus brachyurus* identificado no trabalho. Esse gênero é conhecido como nematoide das lesões radiculares e é um endoparasita migratório conhecido por causar infecções abrindo ferimentos nas raízes. O *Pratylenchus brachyurus* identificado em sete municípios e com maior concentração na região Norte do Paraná. Outras espécies de *Pratylenchus* são relatadas pelo mundo no morangueiro, como *P. crenatus* *P. neglectus* (TSOLOVA; KOLEVA; KALCHEVA, 2017), *P. vulnus*, *P. penetrans* (PARK et al., 2005; SAMALIEV; MOHAMEDOVA, 2011), *P. microdorus* (SAMALIEV; MOHAMEDOVA, 2011), *Pratylenchus zae* (LIMA et al., 2014), *P. pseudoparietinus* (SAMALIEV; MOHAMEDOVA, 2011). Trabalhos de resistência de cultivares de morangueiro a *Pratylenchus brachyurus* não são citados na literatura, no entanto para *Pratylenchus zae* se observa variedades resistentes (LIMA et al., 2014).

O gênero *Helicotylenchus dihystra* foi o nematoide identificado com maior frequência na cultura do morangueiro no estado do Paraná. Este gênero é encontrado parasitando diversas culturas como banana (*Musa spp.*), abacaxi (*Ananas comosus*), abacate (*Persea americana*), goiaba (*Psidium guajava*) e manga (*Mangifera indica*) no Paraná (DIAS-ARIEIRA et al., 2010) Na cultura do morangueiro, apesar de *Helicotylenchus dihystra* ser relatado não é observado sintoma específico (SILVEIRA et al., 1989). Acredita-se que este nematoide apesar de não ser causador de danos diretos pode causar danos indiretos pelos ferimentos abertos nas raízes e assim servir como porta de entrada para patógenos principalmente quando encontrados em altas populações como observados neste trabalho. Trabalhos sobre danos e interações de *Helicotylenchus* com outros fitopatógenos precisam ser realizados para verificar o efeito das interações.

Além dos gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Helicotylenchus* foram encontrados parasitando morangueiro no Paraná os gêneros *Scutellonema*, *Hemicycliophora*, *Xiphinema*, *Ditylenchus*, *Mesocriconema*, *Trichodorus*. O gênero *Aphelenchoides* relatado como um dos principais nematoides causadores de danos

a cultura do morangueiro no Brasil (GOMES; COFCEWICZ, 2003) não foi identificado no nosso estudo.

Os resultados deste estudo indicam que nematoides parasitas de plantas estão distribuídos por todos os campos produtores de morango no Paraná. A identificação de fitonematoídes nas plantações de morango é útil para os produtores que devem considerar os nematoides um risco atual e futuro. Assim conhecendo gêneros/ espécies de nematoides presentes o produtor pode determinar quais medidas de controle são eficientes.

Estes resultados propõem novos estudos com nematoides que estão presentes em altas populações no campo como o *Helicotylenchus dihystera*.

6 CONCLUSÕES

Helicotylenchus dihystera é o nematoide mais frequente na cultura do morangueiro no Paraná.

Outros gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Ditylenchus*, *Mesocriconema*, *Hemicycliophora*, *Trichodorus* e *Xiphinema* também foram encontrados nas amostras.

REFERÊNCIAS

ARIEIRA C. R. D., MOLINA R. O., COSTA A. T. Nematóides Causadores de Doenças em Frutíferas **Agro@mbiente**, vol.2, no.1, jan/jun, Boa Vista, 2008.

BÉLAIR, G.; KHANIZADEH, S. Distribution of plant-parasitic nematodes in strawberry and raspberry fields in Quebec. **Phytoprotection**, v. 75, n. 2, p. 101–107, 1994.

BELLÉ, C.; KULCZYNSKI, S. M.; CESAR BAUER GOMES; PAULO ROBERTO KUHN. Fitonematoides associados à cultura da cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul, Brasil. **Nematropica**, v. 44, n. 2, p. 207–217, 2014.

BRAZ G. B. P., OLIVEIRA R. S., CONSTANTIN J., RAIMONDI R. T. RIBEIRO L. M., GEMELLIS A., TAKANO H. K. Plantas daninhas como hospedeiras alternativas para *Pratylenchus brachyurus* **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 42, n. 3, p. 233-238, 2016

BRUM, D.; GOMES, C. B.; GONÇALVES, M. A.; SIGNIRINI, C. B.; SOMAVILLA, L. Resistência de cultivares de morango à *Meloidogyne arenaria*. In: XXI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas e 4º Mostra científica, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2012. Disponível em: <http://www2.ufpel.edu.br/cic/2012/anais/pdf/CA/CA_00606.pdf>.

CAFÉ FILHO, A. C.; HUANG, C. S. Description of *Pratylenchus pseudofallax* n. sp. with a key to species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae). **Revue de Nématologie**, v. 12, n. 1, p. 7–15, 1989.

CAPRONI, C. M.; FERREIRA, S.; GONÇALVES, E. D.; SOUZA, A. das G. Resposta às aplicações de *Trichoderma*, óleo de Nim e Vertimec no controle de nematoide na cultura do morango. **Revista Agrogeoambiental**, v. 4, n. 3, p. 1–8, 2012.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35–44, 2001.

CASTILLO, P.; VOVLAS, N. ***Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management**. Boston: Brill, 2007.

CHEN, P.; TSAY, T. T. Effect of crop rotation on *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* spp. populations in strawberry fields in Taiwan. **Journal of nematology**, v. 38, n. 3, p. 339–344, 2006.

COSTA, A. F.; ROSSI, D. A.; LEAL, N. R. Origem, evolução e o melhoramento do morangueiro. In: ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, Á. F. (Ed.). **Como produzir morangos**. 1. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2014. p. 33–68.

CONSOLI E. HARAKAVA R., OLIVEIRA S., OLIVEIRA C. M. G., Desenvolvimento de Diagnostico Molecular para Identificação de *Pratylenchus jaehni*, **Rev. Nematologia Brasileira**. v.36 (3-4) 2011.

DE OLANDA, G. B.; LOVATTO, P. B.; SCHIEDECK, G.; MAUCH, C. R. Perspectivas para a produção de morangos no sul do Brasil: uma revisão sobre os sistemas de produção e as práticas de manejo. **Revista da 13ª Jornada de pós-graduação e pesquisa - Congrega**, p. 872–885, 2016.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FURLANETO, C.; SANTANA, S. de M.; BARIZÃO, D. A. O.; RIBEIRO, R. C. F.; FORMENTINI, H. M. Fitonematoides associados a frutíferas na região Noroeste do Paraná , Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1064–1071, 2010.

DIAS, C. N.; MARINHO, A. B.; ARRUDA, R. da S.; SILVA, M. J. P. e; PEREIRA, E. D.; FERNANDES, C. N. V. Produtividade e qualidade do morangueiro sob dois ambientes e doses de biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 10, p. 961–966, 2015.

EISENBACK, J. D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J. N.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): with a pictorial key**. Raleigh: International *Meloidogyne* Project, 1981.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FaoStat**. Production of crops: Strawberries. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/traditional-crops/finger millet/en/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

FACHINELLO J.C., PASSA M.S., SCHMITZ J.D., BETEMPS D.L., Situação e Perspectiva da Fruticultura de Clima Temperado no Brasil. **Rev. Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal-SP**, v. especial, Edição 109-120, outubro, 2011.

GARBIN, L. F.; COSTA, M. J. N. da. Incidência do fitonematoide *Helicotylenchus* em análises laboratoriais do Mato Grosso. **Connection Line**, n. 12, p. 90–96, 2015.

GHULE, T. M.; SINGH, A.; KHAN, M. R. Root knot nematodes: Threat to Indian

agriculture. **Popular Kheti**, v. 2, n. 3, p. 126–130, 2014.

GIMÉNEZ, G.; ANDRIOLO, J.; GODOI, R. Cultivo sem solo do morangueiro. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 273–279, 2008.

GOULART A. M. C. Aspectos Gerais Sobre Nematoides das Lesões radiculare genero (*Pratylenchus*) Planaltina, DF: **Embrapa Cerrado**, 2008.

GOMES, C. B.; COFCEWICZ, E. T. Nematoides. In: FORTES, J. F.; OSÓRIO, V. A. (Ed.). **Morango: Fitossanidade**. Frutas do Brasil. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2003. p. 36.

HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J. T.; GHEYSEN, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, v. 492, n. 1, p. 19–31, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2009.

JANAKA M. A. S., BETTI J. A., KIMATI **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agrônoma Ceres, p. 516-529, 2011.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; MORETZSOHN, M. C.; ROBERTS, P. A.; BALLÉN-TABORDA, C.; BORBA, T. C. O.; VALDISSER, P. A.; VIANELLO, R. P.; ARAÚJO, A. C. G.; GUIMARÃES, P. M.; BERTIOLI, D. J. Genetic mapping of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis stenosperma*: A new source of nematode resistance for peanut. **G3**, v. 6, n. 2, p. 377–390, 2016.

LEMISKA, A.; PAULETTI, V.; CUQUEL, F. L.; ZAWADNEAK, M. A. C. Produção e qualidade da fruta do morangueiro sob influência da aplicação de boro. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 622–628, 2014.

LIMA, C. V.; CRUZ, F. F.; BRUM, D.; GONÇALVES, M. A.; GOMES, C. B. Resistência de cultivares de morangueiro a *Meloidogyne javanica*. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2013. Disponível em: <http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2013/CA_02047.pdf>.

LIMA, C. V.; CRUZ, F. F.; DANIELE BRUM; FISS, A. V.; GONÇALVES, M. A.; CESAR BAUER GOMES. Reação de cultivares de morango a *Pratylenchus zeae*.

(R. C. Franzon, R. L. Barbieri, M. Vizzotto, J. F. M. Pereira, L. E. C. Antunes, Eds.)
In: VI Encontro sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, Pelotas.
Anais... Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2014.

MAI, W. F.; MULLIN, P. G. **Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera**.
5. ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1996.

MENDONÇA, M. M. **Estudos sobre Hoplolaiminae encontrados no Brasil (Nemata: Tylenchoidea)**. 1976. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALq, Universidade de São Paulo, 1976.

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* Species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed.). **Root-Knot nematodes**. 1. ed. Pondicherry: CABI, 2009. p. 1–17.

MUSA, C. I.; WEBER, B.; GONZATTI, H. C.; BARBOSA, L. N.; GALINA, J.; LAGEMANN, C. A.; SOUZA, C. F. V. de; OLIVEIRA, E. C. Cultivo orgânico em substrato: uma experiência inovadora no cultivo do morangueiro no município de Bom Princípio/RS. **InterfaceHS – Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 10, n. 2, p. 38–46, 2015.

OLIVEIRA, C. B. De; BONOW, S. Novos desafios para o melhoramento genético da cultura do morangueiro no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 21–26, 2012.

OLIVEIRA, G. R. F.; SILVA, M. S.; PROENÇA, S. L.; BOSSOLANI, J. W.; CAMARGO, J. A.; FRANCO, F. S.; SÁ, M. E. Influência do *Bacillus subtilis* no controle biológico de nematoides e aspectos produtivos do feijoeiro. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11, n. 1, p. 47–58, 2017.

PARK, S. D.; KHAN, Z.; YEON, I. K.; KIM, Y. H. A survey for plant-parasitic nematodes associated with strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) crop in Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 21, n. 4, p. 387–390, 2005.

PEREIRA, A. C.; TOSCANO, L. C.; ALEXANDRA BOTELHO ABREU; VIEIRA, N. S.; PAMELLA MINGOTTI DIAS. Ocorrência de nematóides fitoparasitos em solo cultivado com algodão e soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 2, n. 4, p. 14–19, 2015.

REIS A., COSTA H. Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. **Embrapa** Brasília DF. 2011

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1289–1296, 2010.

SAMALIEV, H. Y.; MOHAMEDOVA, M. Plant-parasitic nematodes associated with strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) in Bulgaria. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 17, n. 6, p. 730–735, 2011.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO/ DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL. **Fruticultura**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2017_17.pdf>.

SHARMA, R. D.; SILVA, D. B. Da; CASTRO, L. H. R. Efeito de *Helicotylenchus dihystera* sobre trigo e ervilha cultivados em solos provenientes de tres sistemas de preparo. **Nematologia Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 85–95, 1993.

SILVA, M. do C. L. da; SANTOS, C. D. G.; SILVA, G. S. Da. Espécies de *Meloidogyne* associadas a vegetais em microrregiões do estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 4, p. 710–719, 2016.

SILVEIRA, S. G. P. da; CURI, S. M.; ELIAS, R.; PRATES, H. S. Levantamento de nematóide *Meloidogyne hapla* na cultura do morangueiro no estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 5, p. 583–586, 1989.

SOMAVILLA, L.; GOMES, C. B.; OLIVEIRA, R. P. de; CARNEIRO, R. M. D. G. Resistência de cultivares de morangueiro ao nematóide das galhas *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968. **Nematologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 299–301, 2006.

SOUZA, M. T. ; ZAWADENEAK, M. A. . Monitorando e aprendendo o manejo das pragas do morangueiro. **Revista Campo & Negócios HF**, v. 05, p. 58-61, 2018.

SPECHT, S.; BLUME, R. A competitividade da cadeia do morango no Rio Grande do Sul. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 35–59, 2011.

TOMAZINI, M. D.; FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Abundância e diversidade de nematóides em área contíguas de vegetação natural e submetidas a diferentes tipos de uso agrícola. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 185–193, 2008.

TRUDGILL, D. L.; BALA, G.; BLOK, V. C.; DAUDI, A.; DAVIES, K. G.; GOWEN, S. R.; FARGETTE, M.; MADULU, J. D.; MATEILLE, T.; MWAGENI, W.; NETSCHER, C.; PHILLIPS, M. S.; SAWADOGO, A.; TRIVINO, C. G.; VOYOUKALLOU, E. The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. **Nematology**, v. 2, n. 8, p. 823–845, 2000.

TSOLOVA, E.; KOLEVA, L.; KALCHEVA, S. Control and management of plant parasitic nematodes in integrated production of garden strawberries (*Fragaria x Ananassa* Duchesne ex Rozier). **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences**, v. 71, n. 3, p. 225–228, 2017.

ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, Á. F. **Como produzir morangos**. 1. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2014.

ZAMBUDIO, S. **Pesquisa desenvolve controle biológico para combater nematoides**. Disponível em: <<http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/bn.nsf/blbbbc852ee1057183256800005ca0ab/15b0a2fe00870b9583256d39006895e4?OpenDocument>>. Acesso em 08/08/2018.